

# ANEXOS

A continuación se muestran las **Tablas y Figuras adicionales**, las cuales no han sido incluidas en el conjunto de páginas que conforman la “Memoria” del TFG (su referencia sí se encuentra) con motivo de evitar una excesiva extensión o por su relación menor con el tema tratado.

**Tabla I.** Resumen de los 27 ensayos ddPCR llevados a cabo.

Número de ensayo	Motivo del ensayo	Sondas empleadas	Tipo de muestras	Principales conclusiones
1	Comprobación general de resultados	<i>KRAS G12/G13 Multiplex</i>	<u>Solo controles:</u> 4 ADN comerciales y 3 ADN de parafinas secuenciadas por Sequenom.	Nº eventos totales debe ser > 10.000. ADN comercial de Horizon de ↑ calidad. Pueden darse fallos de amplificación. Cada muestra se comporta de manera distinta a misma concentración.
2	Comprobación general de resultados	<i>KRAS G12/G13 Multiplex</i>	<u>Solo controles:</u> 4 ADN comerciales y 3 ADN de parafinas secuenciadas por Sequenom	ADN de parafinas de ↓ calidad. Técnica muy sensible: pueden darse eventos positivos aislados en H <sub>2</sub> O.
3	Comprobación de resultados en 2 ensayos	<i>KRAS G12/G13 Multiplex y BRAF V600E</i>	<u>Controles ensayo KRAS:</u> 2 ADN comerciales, 2 líneas celulares y 3 ADN de parafinas por Sequenom. <u>Controles ensayo BRAF:</u> 2 ADN comerciales y 5 ADN de parafinas secuenciadas por Sequenom.	Se observan dos poblaciones como consecuencia de testar 2 sondas. Fallo en las 2 líneas celulares del ensayo KRAS.
4	Comprobación general de resultados	<i>PIK3CA E545K</i>	<u>Solo controles:</u> 2 ADN comerciales, 3 líneas celulares y 2 ADN de parafinas secuenciadas por Sequenom.	Al acotar mucho el threshold, la especificidad alcanzada puede ser máxima. Puede verse la mutación con ↓ nº eventos.
5	Determinación de la cantidad de muestra a añadir	<i>KRAS G12/G13 Multiplex</i>	<u>Solo controles:</u> 2 ADN comerciales y 6 parafinas secuenciadas por Sequenom, en diferentes concentraciones.	↑ concentración de ADN, ↑ nº de eventos positivos, poblaciones y efecto lluvia (típico parafinas). Técnica muy sensible: mejor separación a ↓ cantidad de ADN. Cantidad inicial óptima a añadir: 20 ng. Difícil discriminación al usar distinta [ ].
6	Determinación de la cantidad de muestra a añadir	<i>PIK3CA E545K</i>	<u>Solo controles:</u> 2 líneas celulares y 2 ADN de parafinas secuenciadas por Sequenom, en diferentes concentraciones.	Población de H <sub>2</sub> O diferente debido a tener solo 5.000 eventos totales. Pueden dar resultados similares pese a usar diferente [ ] (similar <i>fractional abundance</i> ).
7	Determinación de la cantidad de muestra a añadir y gradiente de concentración	<i>PIK3CA E542K</i>	<u>Solo muestras:</u> 1 ADN de parafina (HNC) de la misma muestra (HNC-013-T1) en concentración ascendente de 5 a 120 ng.	A ↑ [ ] añadida, hay mayor número de eventos y efecto lluvia producida. Cantidad inicial óptima a añadir: 20 ng.
8	Testeo de las primeras muestras de plasma (MMC)	<i>TP53 R273H</i>	<u>Muestras:</u> 2 ADN de plasma (MMC) extraídos con kits diferentes (QIAGEN y DANAGENE) <u>Controles:</u> 2 líneas celulares.	Resultados parecidos en los dos kits. Muy pocos eventos en plasma pese a añadir 50-100 ng totales. Solución: emplear kit de pre-amplificación para ↑ material
9	Repetición ensayo 8 con más muestras y sondas	<i>TP53 R273H y BRAF V600E</i>	<u>Ambos ensayos:</u> 5 ADN de plasma (MMC) con kit DANAGENE y 1 ADN comercial para cada sonda.	Misma conclusión ensayo 8: usar pre-amplificación para aumentar número de eventos y concentración de cfDNA.
10	Comparación de resultados en 2 kits diferentes de extracción plasma	<i>BRAF V600E</i>	<u>Muestras:</u> 4 ADN de plasma (MMC) extraídos con kits diferentes (QIAGEN y DANAGEN). <u>Controles:</u> 1 ADN comercial y 1 parafina secuenciada por Sequenom.	No salen eventos positivos FAM, pero los eventos HEX aparecen mucho más compactos y agrupados en el kit QIAGEN (kit con mejores resultados).
11	Testeo de las primeras muestras de parafina (HNC) + ↑ tiempo annealing	<i>PIK3CA E545K</i>	<u>Muestras:</u> 10 ADN de parafinas (HNC) <u>Controles:</u> 2 líneas celulares y 1 ADN de parafina secuenciada por Sequenom.	.Mayor número de eventos positivos en parafina que en plasma (↑ material). Sigue viéndose efecto lluvia de parafina. Técnica muy sensible: aparecen muestras positivas dadas como negativas en el panel de Sequenom (límite detección 10%).
12	Repetición ensayo 11 con otra sonda	<i>PIK3CA H1047R</i>	<u>Muestras:</u> 10 ADN de parafinas (HNC). <u>Controles:</u> 1 ADN comercial, 1 línea celular y 2 ADN de parafinas secuenciadas por Sequenom.	Sigue viéndose efecto lluvia característico de parafina. Solución: ampliar número de ciclos o plantear digestión enzimática. Sonda menos prometedora (mejor E545K).
13	Repetición ensayo 11 con otra sonda	<i>PIK3CA E542K</i>	<u>Muestras:</u> 10 ADN de parafinas (HNC) <u>Controles:</u> 1 línea celular y 3 ADN de parafinas secuenciadas por Sequenom.	No se ha observado saturación en el control negativo de parafina Sequenom. Sonda igual de prometedora que E545K.

14	Testeo muestras pre-amplificadas del ensayo 13	PIK3CA E542K	<u>Muestras:</u> 10 ADNs de parafinas (HNC) pre-amplificadas. <u>Controles:</u> 1 línea celular y 3 ADNs de parafinas secuenciadas por Sequenom.	Si se ha observado saturación en el control negativo, y este provoca el efecto lluvia. Éxito pre-amplificación: clúster mucho más definido y homogeneización de muestras. Sondas muy prometedoras.
15	Testeo muestras pre-amplificadas parafinas (HNC)	4 mutaciones TP53: R175H, R248Q, R273H, R282W	<u>Los cuatro ensayos:</u> 6 ADNs de parafinas (HNC) pre-amplificadas y 1 ADN de parafina secuenciada por Sequenom.	No obstante, sobresaturación en el control positivo de los 4 ensayos, lo que podría afectar al nº eventos de las muestras dando gran cantidad de dobles positivos.
16	Testeo digestión enzimática + ↑nº ciclos para reducir efecto lluvia	PIK3CA C420R	<u>Muestras:</u> 2 ADNs de parafina (HNC) con y sin digestión enzimática. <u>Controles:</u> 1 línea celular y 1 ADN de parafina secuenciada por Sequenom.	La digestión enzimática parece empeorar el resultado, pues ↓nº eventos en gran cantidad en ambas muestras. El aumento del nº ciclos en 50 tampoco parece influir mucho al efecto lluvia.
17	Testeo de las primeras muestras de plasma (PDAC), con la sonda Multiplex	KRAS G12/G13 Multiplex	<u>Muestras:</u> 14 ADNs de plasma (PDAC). <u>Control:</u> 1 ADN de parafina secuenciada por Sequenom.	Muy buena visualización de diferentes poblaciones: cada muestra tiene una mutación diferente. Para determinar la mutación exacta habría que hacer el ensayo KRAS por separado.
18	Repetición ensayo 17 con muestras dudosas	KRAS G12/G13 Multiplex	<u>Muestras:</u> 5 ADNs de plasma (PDAC). <u>Controles:</u> 2 ADNs de parafinas secuenciadas por Sequenom.	Se reafirman las conclusiones del ensayo 17: se confirman las 3 mutaciones más claras y se rechazan las 2 dudosas.
19	Búsqueda de una mutación concreta positiva para un paciente	PIK3CA C420R	<u>Muestras:</u> 3 ADNs de parafinas (HNC) y 2 ADNs de plasma (HNC). <u>Controles:</u> 1 línea celular y 1 ADN de parafina secuenciada por Sequenom.	Se registran eventos positivos en parafina pero negativos en plasma pese a ser del mismo paciente, debido al ↓% mutación. Insistir en ↑cantidad cfDNA o pre-amplificar en plasma. Un evento positivo en agua puede dar mucho margen de error.
20	Repetición ensayo 19 pero con plasmás pre-amplificados	PIK3CA C420R	<u>Muestras:</u> 1 ADN de parafina (HNC), 2 ADNs de plasma (HNC) y 2 ADNs de plasma (HNC) pre-amplificados. <u>Controles:</u> 1 línea celular y 1 ADN de parafina secuenciada por Sequenom.	Fallo en la amplificación debido a una saturación con la sonda en el proceso. En el resto de muestras, sin resultados aparentes.
21	Repetición ensayo 20 solo para el paciente HNC-008 con diferentes sondas	KRAS G12/G13 Multiplex - NRAS G12/G13 Multiplex - KRAS A146T	<u>Los tres ensayos:</u> 1 ADN de parafina (HNC), 2 ADNs de plasma (HNC) pre-amplificado y 4 ADNs de parafinas secuenciadas por Sequenom.	La única muestra positiva es la parafina, a pesar de que no puede confirmarse la mutación exacta por ser sonda Multiplex. No se visualizan diferentes poblaciones. Resultados negativos en todos los plasmás.
22	Testeo de las primeras muestras de plasma (BLC)	PIK3CA E545K	<u>Muestras:</u> 12 ADNs de plasma (BLC). <u>Controles:</u> 2 líneas celulares.	La separación de clústeres es mucho mejor y sin efecto lluvia al ser muestras de plasma. Poco material sin pre-amplificar o poner ↑cantidad cfDNA (hay ↓nº eventos).
23	Testeo de las primeras muestras de orina (BLC) – Repetición ensayo 19 solo plasmás pre-amplificados	PIK3CA E545K y PIK3CA C420R	<u>Ensayo E545K. Muestras:</u> 8 ADNs de orina (BLC) y 8 ADNs de orina (BLC) pre-amplificados. <u>Controles:</u> 2 líneas celulares <u>Ensayo C420R. Muestras:</u> 2 ADNs de plasma (HNC) pre-amplificados. <u>Controles:</u> 1 línea celular y 1 ADN de parafina secuenciada por Sequenom.	No diferencia en la separación de clústeres entre el ADN con y sin pre-amplificar orina, con resultados concordantes. Éxito orina: mejores resultados y número de eventos positivos (más en pre-amplificado). Una muestra ha resultado tener 42% de porcentaje mutacional (BLC-005-U1).
24	Confirmación y comparación de resultados en 3 kits diferentes de extracción orina	PIK3CA E545K	<u>Muestras:</u> 3 ADNs de orina (BLC) con y 4 sin pre-amplificación extraídos con el "Circulating Kit", 3 con y 3 sin pre-amplificación extraídos con el "Viral RNA Mini Kit", y 11 con y 11 sin pre-amplificación extraídos con el "DNA Micro Kit". <u>Controles:</u> 2 líneas celulares.	Resultados negativos en plasma de HNC. Se confirman 3 muestras de orina pre-amp positivas del ensayo 23, y 2 sin pre-amp surgen como duda del "Circulating Kit". Muchos eventos pueden dar efecto lluvia. Salen positivas y coinciden las muestras con y sin pre-amp del "Viral RNA Mini Kit", aunque con ↓nº eventos. Todas las muestras salen coincidentes en el "DNA Micro Kit" con y sin pre-amp respecto al resto de kits, con un nº suficiente de eventos.
25	Testeo de la mutación más común en BLC en orina y plasma	FGFR3 S249C	<u>Muestras:</u> 3 ADNs de orina (BLC) con y 3 sin pre-amplificación extraídos con el "Viral RNA Mini Kit", y 12 ADNs de plasma (BLC) sin pre-amp. <u>Controles:</u> 1 línea celular.	No se observan resultados aparentes en ninguna de las muestras: ni en plasma sin pre-amp (↓material) ni en orina (se eligieron las 3 muestras más positivas del ensayo nº 23).

26	Repetición del ensayo 25 pero con todas las muestras y en plasma pre-amplificado y con orina extraído con el mejor kit ("Circulating Kit")	FGFR3 S249C	Muestras: 12 ADN de plasma (BLC) pre-amplificados y 12 ADN de orina (BLC) extraídos con el "Circulating Kit" sin pre-amp. Controles: 1 línea celular.	Las muestras de plasma sin resultados aparentes, salvo una muestra dudosa. Las de orina con resultados muy prometedoras, con 31% de porcentaje de mutación en la muestra BLC-004-U1 y 36,1% en BLC-007-U1. Las dos anteriores muestras mostraban sobresaturación, con gran cantidad de dobles positivos. Se observa concordancia en diferentes muestras positivas para la mutación PIK3CA E545K (ensayos nº 19 hasta nº 21) y para la FGFR3 S249C.
27	Repetición ensayo 26 reduciendo [ ] y solo con muestras prometedoras	FGFR3 S249C	Muestras: 6 ADN de orina (BLC) extraídas con el "Circulating Kit" sin pre-amp. Controles: 1 ADN de parafina secuenciada por Sequenom.	Se confirma la mutación en 5 de las muestras, incluyendo las 2 con mayor porcentaje de mutación, y se desecha una muestra positiva para PIK3CA E545K. A pesar de reducirse a la mitad la concentración añadida, una muestra sigue siendo muy saturada.

Tabla II. Tabla de valores críticos para el cálculo de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) (SLIDESHARE, 2016).

n	0,995	0,99	0,975	0,95	0,9	0,75	0,5	0,25	0,05	0,025	0,01	0,005
1	7,879	6,635	5,024	3,841	2,706	1,323	0,455	0,102	0,004	0,001	0,000	0,000
2	10,597	9,210	7,378	5,991	4,605	2,773	1,386	0,575	0,103	0,051	0,020	0,010
3	12,838	11,345	9,348	7,815	6,251	4,108	2,366	1,213	0,352	0,216	0,115	0,072
4	14,860	13,277	11,143	9,488	7,779	5,385	3,357	1,923	0,711	0,484	0,297	0,207
5	16,750	15,086	12,833	11,070	9,236	6,626	4,351	2,675	1,145	0,831	0,554	0,412
6	18,548	16,812	14,449	12,592	10,645	7,841	5,348	3,455	1,635	1,237	0,872	0,676
7	20,278	18,475	16,013	14,067	12,017	9,037	6,346	4,255	2,167	1,690	1,239	0,989
8	21,955	20,090	17,535	15,507	13,362	10,219	7,344	5,071	2,733	2,180	1,646	1,344
9	23,589	21,666	19,023	16,919	14,684	11,389	8,343	5,899	3,325	2,700	2,088	1,735
10	25,188	23,209	20,463	18,307	15,987	12,549	9,342	6,737	3,940	3,247	2,558	2,156
11	26,757	24,725	21,820	19,675	17,275	13,701	10,341	7,584	4,575	3,816	3,053	2,603
12	28,300	26,217	23,337	21,026	18,549	14,845	11,340	8,438	5,226	4,404	3,571	3,074

Tabla III. Conversión de los nanogramos adicionados a la sensibilidad alcanzada según Bio-Rad (BIO-RAD, 2015).

	Amount of Amplifiable DNA Analyzed per Assay, ng	QuantaSoft™ Software Readout, copies/μl	Haploid Genome Equivalents*	Maximum Sensitivity**
	400	6,060.6	121,212.1	0.002%
Maximum allowable DNA per well	350	5,303.0	106,060.6	0.003%
	300	4,545.5	90,909.1	0.003%
	250	3,787.9	75,757.6	0.004%
	200	3,030.3	60,606.1	0.005%
	150	2,272.7	45,454.5	0.007%
	100	1,515.2	30,303.0	0.010%
	75	1,136.4	22,727.3	0.013%
	50	757.6	15,151.5	0.020%
	40	606.1	12,121.2	0.025%
	33	500.0	10,000.0	0.030%
	25	378.8	7,575.8	0.040%
	20	303.0	6,060.6	0.050%
	15	227.3	4,545.5	0.066%
	10	151.5	3,030.3	0.099%
	5	75.8	1,515.2	0.198%
Very low DNA input	1	15.2	303.0	0.99%
	0.5	7.6	151.5	1.98%
	0.1	1.5	30.3	9.90%
Minimum copies	0.01	0.2	3.0	99.00%



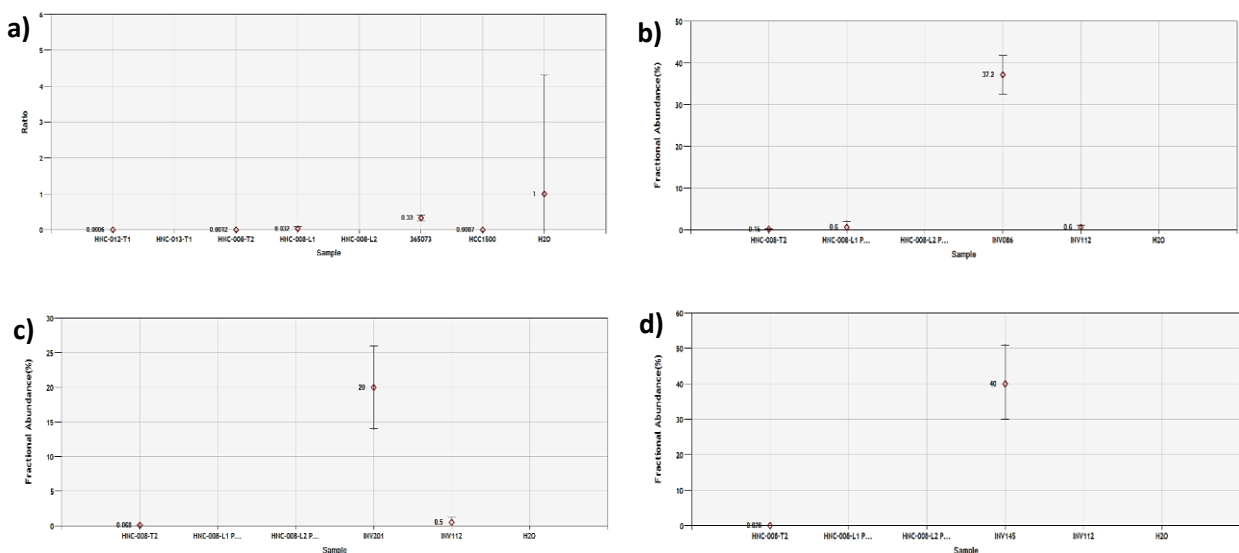


**Tabla X.** Resumen de los resultados numéricos analizados en el ensayo de ddPCR nº 22, con muestras de plasma (BLC) sin pre-amplificación (archivo Excel).

Well	Sample	Target	Concentration	CopiesPer20ulWell	Positives	Negatives	Ch1+Ch2+	Ch1+Ch2-	Ch1-Ch2+	Ch1-Ch2-	FractionalAbundance		
A01	BLC-001-L1	PIK3CA E545K	0	0	0	15244			105	15139		Muestra BLC-001-L1 no detectado	
		PIK3CA E545E	8,1	162	105	15139			0	0			
B01	BLC-002-L1	PIK3CA E545K	0	0	0	12966			69	12897	2,7	Muestra BLC-002-L1 no detectado	
		PIK3CA E545E	6,3	126	69	12897			0	0			
C01	BLC-003-L1	PIK3CA E545K	0	0	0	13551			52	13499	2,7	Muestra BLC-003-L1 no detectado	
		PIK3CA E545E	4,5	90	52	13499			0	0			
D01	BLC-004-L1	PIK3CA E545K	0,1	2	1	12197		1	0	35	12162	2,6	Muestra BLC-004-L1 no detectado
		PIK3CA E545E	3,5	70	36	12162			0	0			
E01	BLC-005-L1	PIK3CA E545K	0,12	2,4	1	9713		1	0	35	9678	0,8	Muestra BLC-005-L1 no detectado
		PIK3CA E545E	4,4	88	36	9678			0	0			
F01	BLC-006-L1	PIK3CA E545K	0,08	1,6	1	14320		1	0	36	14284	0,3	Muestra BLC-006-L1 no detectado
		PIK3CA E545E	3	60	37	14284			0	0			
G01	BLC-007-L1	PIK3CA E545K	0,1	2	1	11794		1	0	120	11674	0,8	Muestra BLC-007-L1 no detectado
		PIK3CA E545E	12,1	242	121	11674			0	0			
H01	BLC-008-L1	PIK3CA E545K	0,09	1,8	1	12628		1	0	281	12347	0,3	Muestra BLC-008-L1 no detectado
		PIK3CA E545E	26,6	532	282	12347			0	0			
A02	BLC-009-L1	PIK3CA E545K	0	0	0	12292			80	12212		Muestra BLC-009-L1 no detectado	
		PIK3CA E545E	7,7	154	80	12212			0	0			
B02	BLC-010-L1	PIK3CA E545K	0	0	0	12980			83	12897	62,8	Muestra BLC-010-L1 no detectado	
		PIK3CA E545E	7,5	150	83	12897			0	0			
C02	BLC-011-L1	PIK3CA E545K	0	0	0	11857			55	11802		Muestra BLC-011-L1 no detectado	
		PIK3CA E545E	5,5	110	55	11802			0	0			
D02	BLC-012-L1	PIK3CA E545K	0	0	0	13077			36	13041		Muestra BLC-012-L1 no detectado	
		PIK3CA E545E	3,2	64	36	13041			0	0			

**Tabla XI.** Resumen de los resultados numéricos analizados en el ensayo de ddPCR nº 23 y nº 24, con muestras de orina (BLC) extraídas con el "Circulating Kit" sin pre-amplificación (archivo Excel).

Well	Sample	Target	Concentration	CopiesPer20ulWell	Positives	Negatives	Ch1+Ch2+	Ch1+Ch2-	Ch1-Ch2+	Ch1-Ch2-	FractionalAbundance		
A01	BLC-001-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0	0	0	15173			86	15087		Muestra BLC-001-U1 no detectado	
		PIK3CA E545E	6,7	134	86	15087			0	0			
B01	BLC-002-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0,14	2,8	2	16731		2	535	16196	0,37	Muestra BLC-002-U1 no detectado	
		PIK3CA E545E	38,2	764	535	16196			0	0			
C01	BLC-003-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0,18	3,6	2	13442		0	5516	7926	0,028	Muestra BLC-003-U1 no detectado	
		PIK3CA E545E	622	12440	5518	7926		2	0	0			
D01	BLC-004-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0,09	1,8	1	12919		1	0	11242	1677	0,004	Muestra BLC-004-U1 no detectado
		PIK3CA E545E	2400	48000	11243	1677			0	0			
E01	BLC-005-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	31,6	632	341	12538		11	330	392	12146	45,8	Muestra BLC-005-U1 no detectado
		PIK3CA E545E	37,4	748	403	12476			0	0			
F01	BLC-006-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0	0	0	16265			922	15343		Muestra BLC-006-U1 no detectado	
		PIK3CA E545E	68,7	1374	922	15343			0	0			
G01	BLC-007-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0	0	0	16895			16884	11		Muestra BLC-007-U1 no detectado	
		PIK3CA E545E	8600	172000	16884	11			0	0			
H01	BLC-008-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0	0	0	14346			3787	10559		Muestra BLC-008-U1 no detectado	
		PIK3CA E545E	361	7220	3787	10559			0	0			
D01	BLC-009-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0,6	12	7	13621		2	5	2449	11172	0,26	Muestra BLC-009-U1 detectado
		PIK3CA E545E	233	4660	2451	11177			0	0			
E01	BLC-010-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0,24	4,8	3	14582		3	0	7976	6606	0,026	Muestra BLC-010-U1 detectado
		PIK3CA E545E	932	18640	7979	6606			0	0			
F01	BLC-011-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0	0	0	14078			3021	11057		Muestra BLC-011-U1 no detectado	
		PIK3CA E545E	284	5680	3021	11057			0	0			
G01	BLC-012-U1 Circulating Kit	PIK3CA E545K	0,18	3,6	2	13027		1	1	3928	9099	0,04	Muestra BLC-012-U1 no detectado
		PIK3CA E545E	422	8440	3929	9100			0	0			



**Figura II.** Gráfico de los diferentes valores de *fractional abundance* calculados para el ensayo de ddPCR nº 19 (a) y nº 21, este último para las 3 sondas testadas: *KRAS G12/G13 Multiplex* (b), *NRAS G12/G13 Multiplex* (c) y *KRAS A146T* (d).

Por último, se suceden a continuación varias páginas de los diferentes **protocolos de los kits de extracción** empleados en este TFG, tanto para la extracción de ADN en biopsias de tumor conservadas en parafina (pág. VII-VIII) como para la extracción de cfDNA en biopsias líquidas de plasma (QIAGEN pág. VIII-IX y DANAGENE pág. X), orina (“*Circulating Kit*” pág. X-XI, “*DNA Micro Kit*” pág. XII-XIII y “*Viral RNA Mini Kit*” pág. XIII-XIV) y saliva (pág. XV).

## **1) Protocolo: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN)**

### **Procedure**

**1. Using a scalpel, trim excess paraffin off the sample block.**

**2. Cut up to 8 sections 5–10 µm thick (see “Starting material”).**

If the sample surface has been exposed to air, discard the first 2–3 sections.

**3. Immediately place the sections in a 1.5 or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied), and add 1 ml xylene to the sample. Close the lid and vortex vigorously for 10 s.**

**4. Centrifuge at full speed for 2 min at room temperature (15–25°C).**

**5. Remove the supernatant by pipetting. Do not remove any of the pellet.**

**6. Add 1 ml ethanol (96–100%) to the pellet, and mix by vortexing.**

The ethanol extracts residual xylene from the sample.

**7. Centrifuge at full speed for 2 min at room temperature.**

**8. Remove the supernatant by pipetting. Do not remove any of the pellet.**

Carefully remove any residual ethanol using a fine pipet tip.

**9. Open the tube and incubate at room temperature or up to 37°C. Incubate for 10 min or until all residual ethanol has evaporated.**

**10. Resuspend the pellet in 180 µl Buffer ATL. Add 20 µl proteinase K, and mix by vortexing.**

**11. Incubate at 56°C for 1 h (or until the sample has been completely lysed). Better: overnight.**

**12. Incubate at 90°C for 1 h.**

The incubation at 90°C in Buffer ATL partially reverses formaldehyde modification of nucleic acids. Longer incubation times or higher incubation temperatures may result in more fragmented DNA.

If using only one heating block, leave the sample at room temperature after the 56°C incubation until the heating block has reached 90°C.

**13. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**

If RNA-free genomic DNA is required, add 2 µl RNase A (100 mg/ml) and incubate for 2 min at room temperature before continuing with step 14. Allow the sample to cool to room temperature before adding RNase A.

**14. Add 200 µl Buffer AL to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Then add 200 µl ethanol (96–100%), and mix again thoroughly by vortexing.**

It is essential that the sample, Buffer AL, and ethanol are mixed immediately and thoroughly by vortexing or pipetting to yield a homogeneous solution. Buffer AL and ethanol can be premixed and added together in one step to save time when processing multiple samples.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL and ethanol. This precipitate does not interfere with the QIAamp procedure.

**15. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**

**16. Carefully transfer the entire lysate to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

**17. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

**18. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.** Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

**19. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol may interfere with some downstream applications.

**20. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column and apply 20–100 µl Buffer ATE to the center of the membrane.**

**Important:** Ensure that Buffer ATE is equilibrated to room temperature. If using small elution volumes (<50 µl), dispense Buffer ATE onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA. QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. The volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

**21. Close the lid and incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.**

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

## **2) Protocolo: QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) -> 1mL Plasma**

### **Procedure**

**1. Pipet 100 µl QIAGEN Proteinase K into a 50 ml centrifuge tube (not provided).**

**2. Add 1 ml of serum or plasma to the 50 ml tube.**

**3. Add 0.8 ml Buffer ACL (containing 1.0 µg carrier RNA). Close the cap and mix by pulse-vortexing for 30 s.**

Make sure that a visible vortex forms in the tube. In order to ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer ACL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

**Note:** Do not interrupt the procedure at this time. Proceed immediately to step 4 to start the lysis incubation.

**4. Incubate at 60°C for 30 min.**

**5. Place the tube back on the lab bench and unscrew the cap.**

**6. Add 1.8 ml Buffer ACB to the lysate in the tube. Close the cap and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15–30 s.**

**7. Incubate the lysate–Buffer ACB mixture in the tube for 5 min on ice.**

**8. Insert the QIAampMini column into the VacConnector on the QIAvac 24 Plus. Insert a 20 ml tube extender into the open QIAamp Mini column.**

Make sure that the tube extender is firmly inserted into the QIAamp Mini column in order to avoid leakage of sample.

**Note:** Keep the collection tube for the dry spin in step 13.

**9. Carefully apply the lysate–Buffer ACB mixture from step 7 into the tube extender of the QIAamp Mini column. Switch on the vacuum pump. When all lysates have been drawn through the columns completely, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar. Carefully remove and discard the tube extender.**

Please note that large sample lysate volumes (about 11 ml when starting with 3 ml sample) may need up to 10 minutes to pass through the QIAamp Mini membrane by vacuum force. For fast and



convenient release of the vacuum pressure, the Vacuum Regulator should be used (part of the QIAvac Connecting System).

**Note:** To avoid cross-contamination, be careful not to move the tube extenders over neighboring QIAamp Mini Columns.

**10. Apply 600 µl Buffer ACW1 to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open, and switch on the vacuum pump. After all of Buffer ACW1 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.**

**11. Apply 750 µl Buffer ACW2 to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open, and switch on the vacuum pump. After all of Buffer ACW2 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.**

**12. Apply 750 µl of ethanol (96–100%) to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open, and switch on the vacuum pump. After all of ethanol has been drawn through the spin column, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.**

**13. Close the lid of the QIAamp Mini column. Remove it from the vacuum manifold, and discard the VacConnector. Place the QIAamp Mini column in a clean 2 ml collection tube, and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.**

**14. Place the QIAamp Mini Column into a new 2 ml collection tube. Open the lid, and incubate the assembly at 56°C for 10 min to dry the membrane completely.**

**15. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 ml elution tube (provided) and discard the 2 ml collection tube from step 14. Carefully apply 20–150 µl of Buffer AVE to the center of the QIAamp Mini membrane. Close the lid and incubate at room temperature for 3 min.**

**Important:** Ensure that the elution buffer AVE is equilibrated to room temperature (15–25°C). If elution is done in small volumes (<50 µl) the elution buffer has to be dispensed onto the center of the membrane for complete elution of bound DNA. Elution volume is flexible and can be adapted according to the requirements of downstream applications. The recovered eluate volume will be up to 5 µl less than the elution volume applied to the QIAamp Mini column.

**16. Centrifuge in a microcentrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min to elute the nucleic acids.**

**Volumes of Buffer ACL and carrier RNA (dissolved in Buffer AVE) required for processing 1 ml, 2 ml or 3 ml samples**

Number of samples	Buffer ACL (ml)			Carrier RNA in Buffer AVE (µl)
	■	▲	●	
1	0.9	1.8	2.6	5.6
2	1.8	3.5	5.3	11.3
3	2.6	5.3	7.9	16.9
4	3.5	7.0	10.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	28.1
6	5.3	10.6	15.8	33.8
7	6.2	12.3	18.5	39.4
8	7.0	14.1	21.1	45.0
9	7.9	15.8	23.8	50.6
10	8.8	17.6	26.4	56.3
11	9.7	19.4	29.0	61.9
12	10.6	21.1	31.7	67.5
13	11.4	22.9	34.3	73.1
14	12.3	24.6	37.0	78.8
15	13.2	26.4	39.6	84.4
16	14.1	28.2	42.2	90.0
17	15.0	29.9	44.9	95.6
18	15.8	31.7	47.5	101.3
19	16.7	33.4	50.2	106.9
20	17.6	35.2	52.8	112.5
21	18.5	37.0	55.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	123.8
23	20.2	40.5	60.7	129.4
24	21.1	42.2	63.4	135.0

### 3) Protocolo: *DANAGENE Circulating DNA Mini Kit (DANAGENE)* -> 1mL Plasma

#### Procedimiento

0. Descongelar el plasma y centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos para eliminar el posible DNA celular contaminante que provenga de células residuales. Utilizar el sobrenadante para la extracción de ADN.

1. Pipetear 1000 µl de plasma/suero en un microtubo de 1.5 ml.
2. Incubar a 55°C durante 15 minutos.
3. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos.
4. Traspasar el SN al tubo de 3 ml suministrado.
5. Añadir 1000 µl de Tampón Lisis PS + 75 µl Proteinasa K. Vortex y mezclar bien.
6. Incubar a 55°C durante 15 minutos.
7. Añadir 750 µl de Isopropanol. Mezclar bien.
8. Pasar 700 µl de la muestra a una MicroSpin columna con su tubo de recolección.

La capacidad de la columna son 800 ul, así que se requiere realizar este paso 4 veces para pasar toda la muestra.

9. Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos.
10. Repetir este proceso 3 veces hasta pasar toda la muestra por la MicroSpin columna. En el cuarto paso centrifugar a 14.000 rpm.
11. Colocar la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recolección y añadir 500 µl de Tampón de Desinhibición en el reservorio de la MicroSpin columna.
12. Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos. Eliminar el líquido.
13. Añadir 500 µl de Tampón de Lavado en el reservorio de la MicroSpin columna.
14. Centrifugar a 14.000 rpm durante 60 segundos. Eliminar el líquido.
15. Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.
16. Eliminar el tubo de recogida e insertar la microspin columna en un microtubo de 1.5 ml.
17. Añadir 30 µl de Tampón de elución (precalentado a 70°C) en la MicroSpin columna.
18. Incubar 2 minutos.

Es muy importante añadir el Tampón de elución en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.

19. Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos.

Recoger los 30 µl y volver a depositar en el centro de la membrana. Esto hace aumentar el rendimiento.

20. Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.

Ahora el microtubo contiene el ADN circulante. Utilizar o almacenar a -20°C.

### 4) Protocolo: *QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN)* -> 4mL Orina

#### Procedure

1. Pipet 500 µl QIAGEN Proteinase K into a 50 ml tube (not provided).
2. Add 4 ml of urine into the 50 ml tube.
3. Add 4 ml of Buffer ACL (with carrier RNA as needed) and 1.0 ml Buffer ATL; close the cap and mix by pulse-vortexing for 30 s.

**Note:** Buffer ATL should be added to the lysis mixture as the last component. Make sure a visible vortex forms in the tube. In order to ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffers ACL and ATL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A precipitate may form upon mixing of the components. This will redissolve during the lysis incubation and does not affect the yield of nucleic acids.

**Note:** Do not interrupt the procedure at this time. Proceed immediately to step 4 to start the lysis incubation.

4. Incubate at 60°C for 30 min.

5. Place the tube back on the lab bench and unscrew the cap.
6. Add 9.0 ml of Buffer ACB to the lysate, close the cap, and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15–30 s.
7. Incubate the lysate–Buffer ACB mixture for 5 min on ice.
8. Insert the QIAamp Mini column into the VacConnector on the QIAvac 24 Plus. Insert a 20 ml tube extender into the open QIAamp Mini column.

Make sure that the tube extender is firmly inserted into the QIAamp Mini column to avoid leakage of sample.

**Note:** Keep the collection tube for the dry spin in step 13.

9. Carefully apply the lysate from step 7 into the tube extender of the QIAamp Mini column. Switch on the vacuum pump. When all lysates have been drawn through the columns completely, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar. Carefully remove and discard the tube extender.

Please note that large sample lysate volumes (about 20 ml when starting with 4 ml urine) may need up to 15 minutes to pass through the QIAamp Mini membrane by vacuum force. For fast and convenient release of the vacuum pressure, the Vacuum Regulator should be used (part of the QIAvac Connecting System).

**Note:** To avoid cross contaminations, be careful not to cross neighboring QIAamp columns while tube extenders are removed.

10. Apply 600  $\mu$ l of Buffer ACW1 to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open and switch on the vacuum pump. After all of Buffer ACW1 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.

11. Apply 750  $\mu$ l of Buffer ACW2 to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open and switch on the vacuum pump. After all of Buffer ACW2 has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.

12. Apply 750  $\mu$ l of ethanol (96–100%) to the QIAamp Mini column. Leave the lid of the column open and switch on the vacuum pump. After all of the ethanol has been drawn through the QIAamp Mini column, switch off the vacuum pump and release the pressure to 0 mbar.

13. Close the lid of the QIAamp Mini column, remove it from the vacuum manifold and discard the VacConnector. Place the QIAamp Mini column in a clean 2 ml collection tube (saved from step 8) and centrifuge at full speed (20,000  $\times$  *g*; 14,000 rpm) for 3 min.

14. Place the QIAamp Mini column into a new 2 ml collection tube, open the lid, and incubate the assembly at 56°C for 10 min to dry the membrane completely.

If using the same heating block used in step 4, reduce the temperature by 4°C.

15. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 ml elution tube and discard the collection tube from step 14. Carefully apply 20–150  $\mu$ l of Buffer AVE to the center of the QIAamp Mini column membrane. Close the lid and incubate at room temperature for 3 min.

16. Centrifuge at full speed (20,000  $\times$  *g*; 14,000 rpm) for 1 min to elute the nucleic acids.

**Volumes of Buffer ACL and carrier RNA (dissolved in Buffer AVE)  
required for processing 4 ml samples**

Number of samples	Buffer ACL (ml)	Carrier RNA in Buffer AVE ( $\mu$ l)
1	4.4	5.6
2	8.8	11.3
3	13.2	16.9
4	17.6	22.5
5	22.0	28.1
6	26.4	33.8
7	30.8	39.4
8	35.2	45.0
9	39.6	50.6
10	44.0	56.3
11	48.4	61.9
12		52.8
13		57.2
14		61.6
15		66.0
16		70.4
17		74.8
18		79.2
19		83.6
20		88.0
21		92.4
22		96.8
23		101.2
24		105.6

## 5) Protocolo: *QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN)* -> 1mL Orina

### Procedure

**1. Transfer up to 1 ml urine to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 2 min.**

If the volume of the urine sample is between 1 and 10 ml, pellet the cells in an appropriately sized centrifugation tube. Discard the supernatant, add 500 µl Buffer AE to the pellet, and vortex for 5 s. Briefly centrifuge and transfer the sample to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Continue the procedure from step 3.

**2. Discard the supernatant, add 500 µl Buffer AE, and vortex for 5 s.**

**3. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 2 min.**

**4. Discard the supernatant, add 300 µl Buffer ATL and 20 µl Proteinase K to the pellet, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**

Adding 20 µl 1 M DTT may increase sensitivity, since urine can contain sperm cells which can only be lysed in the presence of reducing agents such as DTT or β-mercaptoethanol.

**5. Place the 1.5 ml tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for 1 h.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 15 min to improve lysis.

**6. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**

**7. Add 300 µl Buffer AL and 50 µl ethanol (96–100%), close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**

To ensure efficient binding in step 9, it is essential that the sample, Buffer AL, and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

**Note:** We recommend adding carrier RNA to Buffer AL (see page 14). Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer AE and then added to Buffer AL.

**8. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**

**Note:** The white precipitate which may appear in step 7 does not need to be pelleted. It can be transferred to the QIAamp MinElute Column together with the lysate, and does not interfere with the QIAamp procedure.

**9. Carefully transfer the supernatant from step 8 to the QIAamp MinElute Column without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute Column is empty.

**10. Carefully open the QIAamp MinElute Column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

**11. Carefully open the QIAamp MinElute Column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute Column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute Column. Take care when removing the QIAamp MinElute Column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute Column.

**12. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

**13. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute Column and apply 20–50 µl Buffer AE or distilled water to the center of the membrane.**

If high pH or EDTA affects sensitive downstream applications, use water for elution (see page 11).

**Important:** Ensure that Buffer AE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer AE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA. QIAamp MinElute Columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

**14. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.**

Incubating the QIAamp MinElute Column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

**Volumes of Buffer AL and dissolved carrier RNA required for one DNA preparation using the QIAamp DNA Micro Kit**

Protocol for isolation of genomic DNA from	Volume of Buffer AL added to sample	Dissolved carrier RNA
Small volumes of blood (page 15)	100 µl	1 µl
Dried blood spots (page 18)	200 µl	1 µl
Swabs (page 21)	600 µl* or 400 µl†	1 µl
Chewing gum (page 25)	300 µl	1 µl
Forensic samples (page 28)	300 µl	1 µl
Urine (page 32)	300 µl	1 µl
Tissues (page 35)	200 µl	1 µl
Laser-microdissected tissues (page 38)	50 µl	1 µl

\* If using ejectable swabs.

† If using non-ejectable swabs.

## 6) Protocolo: QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) -> 140 µL Orina

### Procedure

**1. Pipet 560 µl prepared Buffer AVL containing carrier RNA into a 1.5 ml microcentrifuge tube.**

**Note:** If the sample volume is larger than 140 µl, increase the amount of Buffer AVL–carrier RNA proportionally (e.g., a 280 µl sample will require 1120 µl Buffer AVL–carrier RNA) and use a larger tube.

**2. Add 140 µl plasma, serum, urine, cell-culture supernatant or cell-free body fluid to the Buffer AVL–carrier RNA in the microcentrifuge tube. Mix by pulse-vortexing for 15 s.**

**Note:** To ensure efficient lysis, it is essential that the sample is mixed thoroughly with Buffer AVL to yield a homogeneous solution. Frozen samples that have only been thawed once can also be used.

**3. Incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min.**

**Note:** Viral particle lysis is complete after lysis for 10 min at room temperature. Longer incubation times have no effect on the yield or quality of the purified RNA.

**4. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.**

**5. Add 560 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the tube to remove drops from inside the lid.**

**Note:** Use only ethanol, since other alcohols may result in reduced RNA yield and purity. Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. If the sample volume is greater than 140 µl, increase the amount of ethanol proportionally (e.g., a 280 µl sample will require 1120 µl ethanol). To ensure efficient binding, it is essential that the sample is mixed thoroughly with the ethanol to yield a homogeneous solution.

**6. Carefully apply 630 µl of the solution from step 5 to the QIAamp Mini column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini column into a clean 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.**

**Note:** Close each spin column to avoid cross-contamination during centrifugation.

**Note:** Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) to limit microcentrifuge noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the viral RNA. If the solution has not completely passed through the membrane, centrifuge again at a higher speed until all of the solution has passed through.

**7. Carefully open the QIAamp Mini column, and repeat step 6. If the sample volume was greater than 140 µl, repeat this step until all of the lysate has been loaded onto the spin column.**

**8. Carefully open the QIAamp Mini column, and add 500 µl Buffer AW1. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.**

**Note:** It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 even if the original sample volume was larger than 140 µl.

**9. Carefully open the QIAamp Mini column, and add 500 µl Buffer AW2. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min. Continue directly with step 11, or to eliminate possible Buffer AW2 carryover, perform step 10 and then continue with step 11.**

**Note:** Residual Buffer AW2 in the eluate may cause problems in downstream applications. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in flow-through, containing Buffer AW2, contacting the QIAamp Mini column. Removing the QIAamp Mini column and collection tube from the rotor may also cause flow-through to come into contact with the QIAamp Mini column. In these cases, the optional step 10 should be performed.

**10. Recommended: Place the QIAamp Mini column in a new 2 ml collection tube (not provided), and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.**

**11. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Discard the old collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini column and add 60 µl Buffer AVE equilibrated to room temperature. Close the cap, and incubate for 1 min.**

**12. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.**

A single elution with 60 µl Buffer AVE is sufficient to elute at least 90% of the viral RNA from the QIAamp Mini column. Performing a double elution using 2 x 40 µl Buffer AVE will increase yield by up to 10%. Elution with volumes of less than 30 µl will lead to reduced yields and will not increase the final concentration of RNA in the eluate.

Viral RNA is stable for up to one year when stored at –30 to –15°C or at –90 to –65°C.

**Volumes of Buffer AVL and carrier RNA–Buffer AVE mix required for the QIAamp Viral RNA Mini procedure**

No. samples	Buffer AVL (ml)	Carrier RNA–AVE (µl)	No. samples	Buffer AVL (ml)	Carrier RNA–AVE (µl)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.4	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

## **7) Protocolo: *DANAGENE Swabs DNA Kit (DANAGENE)***

### **Procedimiento**

- 1. Añadir 600 µl de Tampón de Lisis en un microtubo de 2.0 ml.**
- 2. Cortar la cabeza del cepillo con un poco de mango e introducirla en el microtubo. Vortex vigorosamente para liberar las células del cepillo.**
- 3. Añadir 5 ul de Proteinasa K + 5 ul de RNasa.**
- 4. Incubar a 37°C durante 30 minutos. Realizar varios vortex durante el periodo de incubación.**
- 5. Retirar la cabeza del cepillo de la solución de lisis, frotándolo contra las paredes para recoger la máxima cantidad de líquido.**
- 6. Añadir 200 µl de Tampón de precipitación de proteínas.**
- 7. Vortex vigorosamente durante 30 segundos.**
- 8. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 5 minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.**
- 9. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de 1.5 ml que contenga 600 µl de isopropanol. Mezclar por inversión varias veces.**
- 10. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 3 minutos.**
- 11. Eliminar el sobrenadante. Añadir 600 µl de etanol 70% e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.**  
Vigilar no perder el pellet de ADN que será muy pequeño o indetectable y será más visible después del lavado de etanol 70%.
- 12. Centrifugar a 13.000-16.000 x g durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol.**  
Vigilar no perder el pellet de ADN
- 13. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 5 minutos.**
- 14. Añadir 30-40 µl de Tampón de Hidratación del ADN y resuspender con micropipeta.**
- 15. Conservar a 2-8°C.**  
Para almacenajes largos conservar a -20°C o -80°C.